

METHOD FOR CULTURE AND DEVICE THEREFOR

Patent Number: JP5268933
Publication date: 1993-10-19
Inventor(s): KAMINAGAYOSHI TSUYOSHI; others: 03
Applicant(s):: HITACHI LTD; others: 01
Requested Patent: ☐ JP5268933
Application Number: JP19920066890 19920325
Priority Number(s):
IPC Classification: C12M1/02
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To efficiently multiply cells in cell culture liable to be influenced by shearing action caused by stirring and to form cell lump.

CONSTITUTION: In the case of cell culture liable to be influenced by shearing action caused by stirring and to form cell lump, high-speed rotation hardly to cause cell lump and low-speed rotation hardly to affect cells by shearing action caused by stirring are repeated to efficiently multiply cells. In the operation, when high-speed rotation is carried out in order to prevent formation of cell lump, the cells are damaged by shearing action. However, a time in which the high-speed rotation is done is short, the cells are only partly damaged and can recover within a time in which low-speed rotation is carried out and the cells are hardly influenced.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-268933

(43) 公開日 平成5年(1993)10月19日

(51) Int.Cl.⁵

C 1 2 M 1/02

識別記号

A

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数6(全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平4-66890

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

(22) 出願日 平成4年(1992)3月

駿河台四丁目6番地

JP 5-268933
is not listed on
the ISR.

区戸塚町216番地

豊井794番地 株式会
場内

豊井794番地 株式会
場内

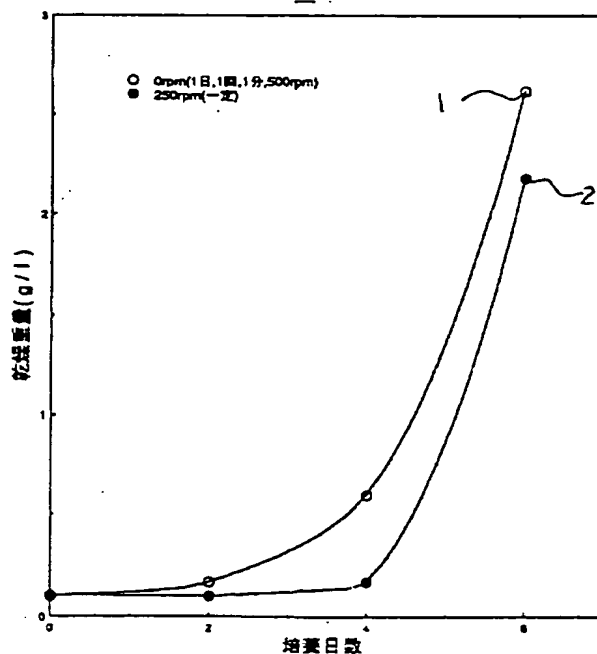
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 培養方法及び装置

(57) 【要約】

【目的】 攪拌による剪断作用の影響を受け易く、細胞塊を形成し易い細胞の培養において、細胞を効率よく増殖させる培養方法を提供することにある。

【構成】 攪拌による剪断作用の影響を受け易く、細胞塊を形成し易い細胞を培養する場合において、細胞塊を形成させにくい高速回転と攪拌による剪断作用の影響を受けにくい低速回転を繰り返すことによって、効率よく細胞を増殖させる。この時、細胞塊の形成を防ぐため高速回転を行うと細胞は、剪断作用によりダメージを受ける。しかし、高速回転を行う時間が短時間であれば、ダメージを受ける細胞は一部であり、次の剪断作用を受けにくい低速回転を行う時間内で、回復が可能である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 攪拌式培養方法において、攪拌翼の高速回転と低速回転とを繰り返すことを特徴とする培養方法。

【請求項2】 前記攪拌翼の高速回転の時間を低速回転の時間より短時間にすることを特徴とする請求項1記載の培養方法。

【請求項3】 前記攪拌翼の高速回転の時間を10分未満にすることを特徴とする請求項1、又は請求項2記載の培養方法。

【請求項4】 前記攪拌翼の高速回転から次の高速回転までの時間を3時間より長く、3日未満にすることを特徴とする請求項1、又は請求項2記載の培養方法。

【請求項5】 前記攪拌翼の高速回転の回転数を低速回転の回転数の2倍よりも高くすることを特徴とする請求項1、又は請求項2、又は請求項3、又は請求項4記載の培養方法。

【請求項6】 攪拌式培養装置において、前記培養装置の攪拌翼の高速回転する時間を低速回転する時間より短時間として、該高速回転と低速回転とを繰り返すように構成したことを特徴とする培養装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、攪拌式の培養方法に関するものである。更に詳しくは、攪拌による細胞のダメージを受け、細胞塊を作る傾向にある、例えば糸状菌のような細胞の培養を行う方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 各種微生物の液体培養において、培地組成と共に酸素供給条件が増殖に大きく影響することは、すでに認められていることである。通常、液体培養を行う場合、培地液中への酸素供給は通気攪拌によって供給される。この時おこなわれる攪拌の役割は、培養液の均一性を保つことと、培養液中への酸素供給効率を上げることである。したがって、酸素供給の効果を上げるためには、攪拌速度を高くする必要がある。

【0003】 ところが、日本醗酵工学会雑誌(54, 818-829, 1979)には微生物細胞に与える攪拌による剪断作用の影響について次のことが述べられている。

【0004】 すなわち、攪拌速度を高くすることは、必然的に流動の剪断作用を伴うため、それが微生物細胞の増殖や生理活性に悪影響を与えることがあり、微生物のうちでも、特に細胞が大きく、長い糸状菌菌糸体への剪断作用の影響が大きいとある。このことから、酸素供給の効果があり、かつ、剪断作用の影響の小さい条件で回転域で培養を行わなければならないと言える。

【0005】 しかし、剪断の悪影響を考慮して、攪拌速度を遅くすると今度は培養液中に細胞塊が形成されてしまう。例えば糸状菌であれば、攪拌速度の低下と共にベレット状の菌糸塊が培養液中に形成され、菌糸塊の直径も大きくなっていく。菌糸塊の形成は、酸素供給の悪化を

招き、酸素供給の悪い菌糸塊中心部の菌体の吸収速度は、低下してくるのである。このことは、日本醗酵協会誌(24, 293-304, 1966)に示されており、菌糸塊を形成しないような回転数で培養を行うことが望ましいと言える。

【0006】 以上のように、各種微生物の液体培養を行う場合、これまでは攪拌による剪断作用の影響と細胞塊の形成について考慮して、この2つを解決する回転数で培養を行っていた。しかしながら、攪拌による剪断作用の影響を受け易く、細胞塊を形成し易い細胞を培養する場合では、両方の条件を満たす最適な回転数を見い出すことが困難であった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 上記従来技術では、攪拌による剪断作用の影響を受け易く、細胞塊を形成し易い細胞を培養する場合この2点を解決する回転数を見い出すことが困難であるという問題があった。

【0008】 本発明の目的は、攪拌による剪断作用の影響を受け易く細胞塊を形成し易い細胞を効率よく増殖させる培養方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】 上記目的は、培養中の攪拌条件を一定回転数に固定せず、回転数に変化をつけることで達成できる。

【0010】 すなわち、本発明は、攪拌による剪断作用の影響を受け易く、細胞塊を形成し易い細胞を培養する場合において、細胞塊を形成させにくい高速回転と攪拌による剪断作用の影響を受けにくい低速回転とを繰り返すことによって、効率よく細胞を増殖させることである。この時、細胞塊の形成を防ぐため高速回転を行うと細胞は、剪断作用によりダメージを受ける。しかし、高速回転を行う時間が短時間であれば、ダメージを受ける細胞は一部であり、次の剪断作用を受けにくい低速回転を行う時間内で、回復が可能である。

【0011】 そこで、剪断作用による細胞のダメージを防ぐために高速回転を行う時間を低速回転を行う時間よりも短時間にし、また、高速回転の開始から次の高速回転を行う時間を長くおき、高速回転の回転数を低速回転の回転数より大きくしたものである。

【0012】

【作用】 本発明は、攪拌による剪断作用の影響を受け易く、細胞塊を形成し易い細胞を培養する場合において、細胞塊を形成させにくい高速回転と攪拌による剪断作用の影響を受けにくい低速回転を繰り返すことによって、効率よく細胞を増殖させることを可能とした。また、この時、細胞塊の形成を防ぐため高速回転を行うと細胞は、剪断作用によりダメージを受けるが、高速回転を行う時間を短時間にする事で、ダメージを受ける細胞の一部に減らし、次の剪断作用を受けにくい低速回転を行う時間内で、ダメージを受けた細胞を回復させることを

可能としたものである。

【0013】

【実施例】以下、本発明の一実施例を図1により説明する。

【0014】本発明の有効性を示すために、ジャーファーマンターを用いて、剪断作用の影響が大きく、菌糸塊を形成し易いシイタケの菌糸体の液体培養を実施した。

【0015】ジャーファーマンターは、内容積5リットルのものを2基用い、その構造は、硬質ガラス製の水槽にステンレス製の部品を取り付けたもので、PH計、D 10 O計、温度調節計を備えたものである。

【0016】材料としては、あらかじめ液体培地で浸とう培養したシイタケの菌糸体（約400mg dry weight）を*

*ホモジナイズしたものをそれぞれ用いた。

【0017】培養条件については、表1に示した。液体培地はGPY-2培地を用い、その組成については表2に示した。回転数は0rpmと250rpmとし、0rpmの方は、1日サンプリング前に1回、500rpm、1分間与える間欠回転とし、250rpmの方は常に一定回転とした。抜出した培養について、培養液10ml中の菌体の乾重を調査した。菌体の乾重は、東洋濾紙 NO.101 を用いて自然濾過した後、約50mlの蒸留水で洗浄し、菌体を濾紙と共に105℃で重さが減少しなくなるまで乾燥し、全乾燥重量より濾紙重量を差引いたものを菌糸体の乾燥重量とした。

【0018】

【表1】

表 1

培 地 組 成	G P Y - 2 培 地
培 養 日 数	6 日
培 養 温 度	2 5 ℃
初 発 菌 体 量	4 0 . 0 mg dry weight
通 気 量	1 . 5 N ℓ / min
培 地 量	3 . 5 ℓ
回 転 数	0 rpm (500 rpm, 1日1回1分), 250 rpm (一定)

【0019】

※ ※ 【表2】

表 2

培地組成	G P Y - 2 培 地 (mg/ℓ)
Major Elements	
グルコース	2 0 , 0 0 0 . 0
ポリペプトン	5 , 0 0 0 . 0
イーストエキス	1 , 0 0 0 . 0
Minor Elements	
KH ₂ PO ₄	1 , 0 0 0 . 0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5 0 0 . 0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	5 0 0 . 0
FeCl ₂ · 6H ₂ O	1 . 0
MnCl ₂ · 4H ₂ O	7 . 2
ZnCl ₂	4 . 0
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1 . 0

(p H 5 . 6)

【0020】乾燥重量の調査の結果より、図1の回転数 50 の影響について示した。シイタケ菌糸体を6日間培養し

5

た結果、回転数0rpm(間欠運転)の方が、250rpm(一定回転)よりも増殖が良好となった。また、0rpmは培養液中に小粒の細胞塊(菌糸塊)を形成はしたが、大きな細胞塊を形成することはなかった。

【0021】以上の結果から、回転数0rpmが250rpmに比べ菌糸体の増殖が良かったのは、0rpmと回転を与えぬことにより攪拌の剪断作用による細胞へのダメージが殆どなかったことと、1日、1回、1分、500rpmの回転を与えることで細胞塊の形成を押さえたためと推察される。

【0022】

6

【発明の効果】本発明によれば、攪拌による剪断作用の影響を受け易く、細胞塊を形成し易い細胞の培養において、細胞塊を形成しにくい高速回転と剪断によるダメージを受けにくい低速回転を繰り返すことで、細胞を効率的に増殖させることができる。

【図面の簡単な説明】

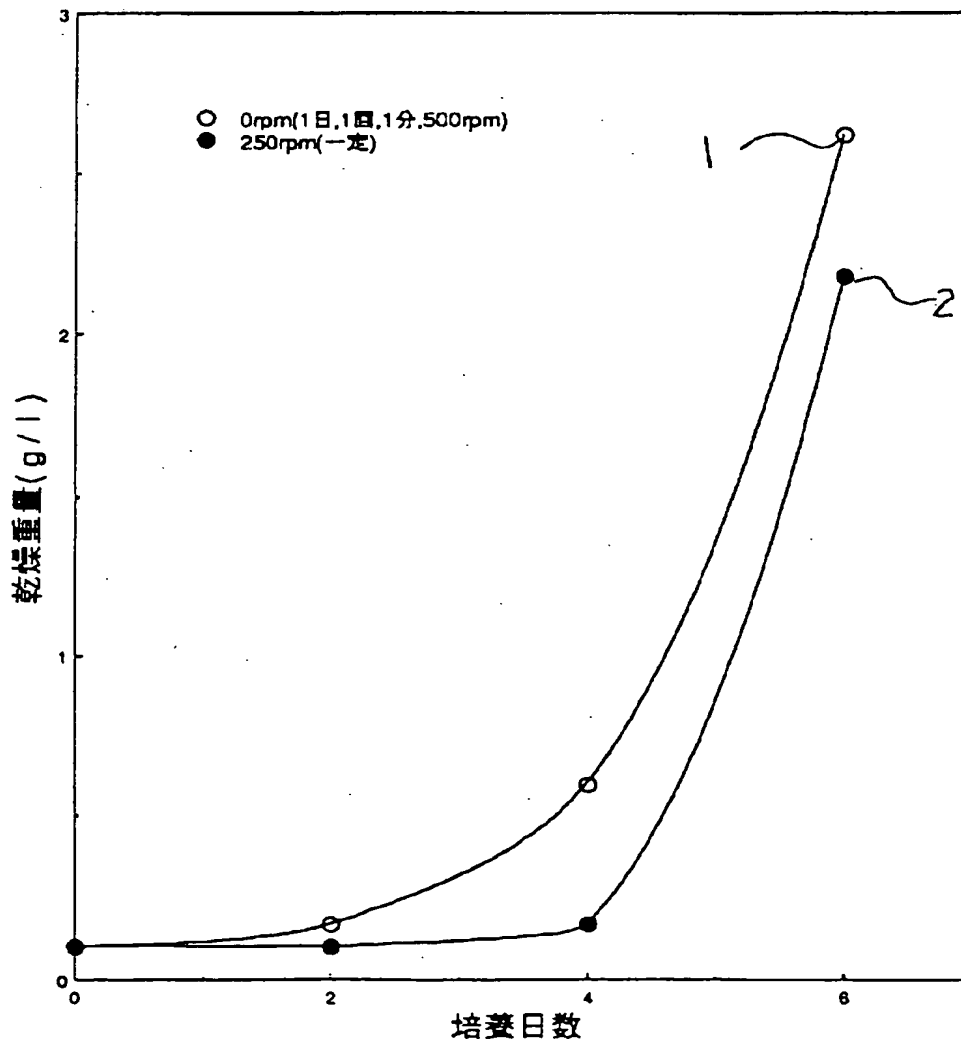
【図1】本発明の一実施例のシイタケの菌糸体増殖に与える回転数の影響を示す説明図である。

【符号の説明】

10 1…回転数0rpmのプロット点、2…回転数250rpmのプロット点。

【図1】

図 1



フロントページの続き

(72)発明者 中野 隆盛

山口県下松市大字東豊井794番地 株式会
社日立製作所笠戸工場内

(72)発明者 加藤 博紀

山口県下松市大字東豊井794番地 株式会
社日立京商笠戸事業所内